

Tabelle 1. Experimentell auf zwei Arten ermittelte Lamellenperioden von 1–4 in nm.

Verbindung	TEM	FT
DAS 1	0.63–1.25	0.7
DAC-Cl 3	0.86–1.13	1
DAC-CO ₃ 4	1.6–1.92	1.7
DAC-I 2	8–12	10

lation der Ergebnisse beider Methoden zeigt Tabelle 1. DAC-I weist die größte Periode auf.

Durch physikalisch-chemische Untersuchungen hatten wir die kritische Micellenbildungskonzentration (CMC) für DAS, DAC-Cl und DAC-CO₃ zu 1420, 20, 2600 bzw. 300 ppm und die Fläche pro Molekül mit einer Langmuir-Filmwaage zu 100, 116, 62 bzw. 78 Å² bestimmt^[5]. Am bemerkenswertesten war der kleinste CMC-Wert (20 ppm) und die größte Fläche pro Molekül (116 Å²) für DAC-I. Seine ungewöhnliche dreidimensionale Anordnung und seine Lamellenperiode von 10 nm als größter Wert in dieser Reihe lassen sich nicht durch den geringen Unterschied der van-der-Waals-Durchmesser von Chlorid (4.2 Å) und Iodid (4.6 Å) erklären. Eine alternative Erklärung hingegen könnte die Bildung eines etwa 18gliedrigen Makrocyclus durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidgruppen der beiden Ketten mit ionischen Endgruppen sein (Abb. 3). Der chaotrope Charakter^[8] des Iodid-Ions, das eng an

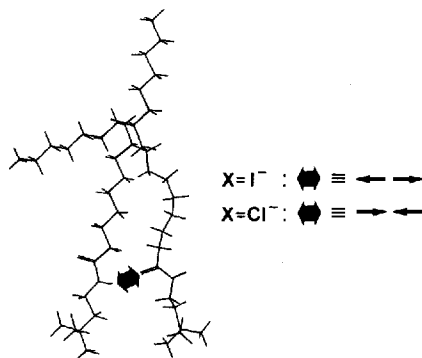


Abb. 3. Die energieminierte Struktur veranschaulicht die Bildung eines Makrocyclus bei den kationischen Bolaamphiphilen 2–4 durch H-Brücken zwischen Carboxyl-O und Amid-NH. Für X = I stört das Gegenion die bindende Wechselwirkung durch Vergrößerung des N-O-Abstandes.

die Trimethylammonium-Endgruppe gebunden ist, könnte die Bildung eines solchen Makrocyclus stören, was eine ausgedehnte Anordnung des Moleküls mit einem größeren Flächenbedarf an der Gas-Flüssigkeits-Grenzschicht zur Folge haben könnte. Darüber hinaus würde der stärker hydrophobe Charakter des Bolaamphiphils zu einem geringeren CMC-Wert führen. Mit den anderen Gegenionen ohne chaotrope Eigenschaften dagegen bliebe die makrocyclische molekulare Anordnung aufrecht erhalten, so daß eine kleinere Oberfläche durch das bolaamphiphile Molekül eingenommen würde. Die Bildung derartiger Makrocyclen würde darüber hinaus die gemessenen Lamellenperioden der Bolaamphiphile (Tabelle 1) erklären.

Es ist bemerkenswert, daß Bolaamphiphile bei niedrigen Konzentrationen multilamellare Aggregate bilden. Die Morphologie der stabilen Aggregate variiert in Abhängigkeit von den ionischen Gruppen des Bolaamphiphils und von der Natur des Gegenions.

Eingegangen am 8. März,
veränderte Fassung am 23. April 1994 [Z 6738]

- [1] J. H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley, New York, 1982.
- [2] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304.
- [3] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, G. R. Baker, R. K. Behera, G. H. Escamilla, M. J. Saunders, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 901; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 917.
- [4] J. H. Fuhrhop, W. Kaufmann, F. Schambil, *Langmuir* **1985**, *1*, 387.
- [5] P. Bosch, F. J. Sánchez-Baeza, J. L. Parra, *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 2095.
- [6] Y. Okahata, S. Tanamachi, M. Nagai, T. Kunitake, *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *82*, 401.
- [7] J. Köning, C. Boettcher, H. Winkler, E. Zeitler, Y. Talmon, J. H. Fuhrhop, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 693.
- [8] T. Pigor, R. Lawaczek, *Z. Naturforsch. C* **1983**, *83*, 307.

Neuartiges Verfahren zur Herstellung von Bibliotheken kleiner organischer Moleküle**

Thomas Carell, Edward A. Wintner,
A. Bashir-Hashemi und Julius Rebek, Jr.*

Die Suche nach pharmazeutischen Wirkstoffen setzt traditionell die Synthese und Isolierung von Einzelverbindungen sowie die Bewertung ihrer biologischen Aktivität voraus. Es müssen Hunderte von Verbindungen hergestellt und geprüft werden, bevor eine Substanz mit signifikanter Aktivität identifiziert werden kann. Diese wird dann als Verbindung mit einer Leitstruktur für die Entwicklung eines aussichtsreichen Arzneistoffkandidaten herangezogen. Stellt man allerdings statt Einzelverbindungen Mischungen (Bibliotheken) einer großen Zahl biologisch potentiell aktiver Verbindungen her, läßt sich die zeitaufwendige Suche nach einer Leitstruktur beschleunigen. Moderne Screening- und Isolierungsverfahren bieten heute das Rüstzeug zur Identifizierung und Isolierung von Verbindungen mit spezifischen biologischen Eigenschaften aus einer solchen Bibliothek^[1]. Um die Schwierigkeiten bei der Herstellung und Handhabung von Mischungen zahlreicher Verbindungen zu beseitigen, wurden Strategien entwickelt, nach denen Bibliotheken linearer Peptide an einem festen Träger synthetisiert und auf vielversprechende Leitstrukturen geprüft werden^[2]. Zwar können durch diese Methode komplexe Bibliotheken hergestellt werden, doch haben von trägergebundenen Peptiden abgeleitete Leitstrukturen Nachteile: Wegen ihrer inneren konformativen Beweglichkeit müssen sie erheblich modifiziert werden, bevor ein geeigneter Wirkstoffkandidat vorgeschlagen werden kann. Darüber hinaus kann die Konformation des immobilisierten Peptids durch den festen Träger signifikant beeinflusst werden, so daß die experimentell bestimmte biologische Wirkung nicht die Aktivität der freien Verbindung in Lösung widerspiegelt.

Daher haben wir ein neues Verfahren gesucht, um Bibliotheken kleiner, halbstarrrer Verbindungen in Lösung herzustellen und daraus mit einer Screeningmethode aktive Verbindungen zu

[*] Prof. J. Rebek, Jr., Dr. T. Carell, E. A. Wintner
Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)
Telefax: Int. + 617/253-7929
Dr. A. Bashir-Hashemi
GEO-CENTERS
762 Rt. 15 South
Lake Hopatcong, NJ 07849 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert. T. C. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Feodor-Lynen-Stipendium, E. A. W. der National Science Foundation für ein Promotionsstipendium. K. Shimizu gilt unser Dank für die Synthese von 9,9-Dimethylxanthin-2,4,5,7-tetracarbonsäure, Prof. K. Biemann für hilfreiche Diskussionen zur massenspektrometrischen Analyse.

isolieren. Zur Synthese der Bibliotheken ließen wir konformativ starre Zentralmoleküle mit mehreren reaktiven Gruppen und eine Mischung kleiner reaktiver organischer Moleküle (Bausteine) miteinander reagieren (Abb. 1), wobei jeder Baustein durch eine komplementäre funktionelle Gruppe kovalent an das Zentralmolekül gebunden werden kann.

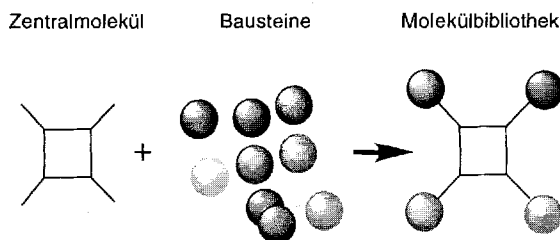
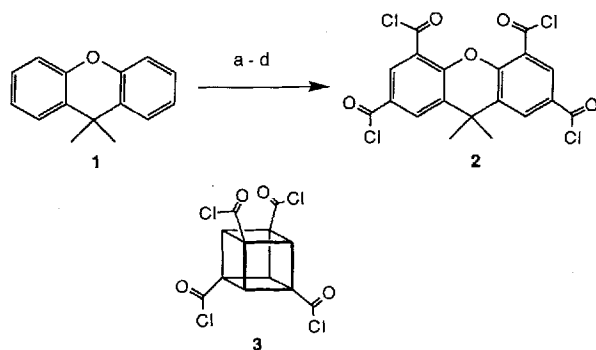


Abb. 1. Schematische Darstellung des Verfahrens zum Aufbau einer Bibliothek kleiner organischer Moleküle.

Dabei bestimmt die räumliche Anordnung der reaktiven Gruppen am Zentralmolekül die Gesamtstruktur der Moleküle in der Bibliothek, und durch das statistische Anknüpfen der Bausteine an das Gerüst kann theoretisch jede mögliche Kombination von Bausteinen gebildet werden. Eine Vielzahl von Zentralmolekülen kann mit einer Vielzahl von Bausteinen kombiniert werden, um Bibliotheken mit einer nahezu unbegrenzten Zahl konformativ eingeschränkter Moleküle zu erhalten. Als erste exemplarische Zentralmoleküle haben wir 9,9-Dimethylxanthen-2,4,5,7-tetracarbonsäurechlorid **2** und Cuban-1,3,5,7-tetracarbonsäurechlorid **3** gewählt^[3]. Die angeknüpften Bausteine liegen am Xanthen-Zentralmolekül **2** in einer scheibenförmigen und am Cuban-Zentralmolekül **3** in einer eher kugelförmigen Anordnung vor. Die Synthese von **2** gelang in vier Stufen ausgehend von 9,9-Dimethylxanthen **1** (Schema 1).



Schema 1. Cuban **3** und Synthese des Xanthens **2**. a) Br_2 , Fe-Pulver (kat.), CH_2Cl_2 , 20°C, 2 h, 4 h Rückfluß, 93%; b) CuCN , *N*-Methyl-2-pyrrolidin, 2 h Rückfluß, HNO_3 (20%), 10 h Rückfluß, 98%; c) NaOH , Wasser, 14 h Rückfluß, 98%; d) PCl_5 , Benzol, 12 h Rückfluß, 68% [4].

Geeignete Bausteine wurden nach der Bewertung zahlreicher Reaktionen des Xanthentetracarbonsäurechlorids **2** und individueller Amine ausgewählt. Dabei war eine vergleichbare Reaktivität gegenüber den Säurechloridgruppen des Zentralmoleküls das Hauptkriterium. Die Produkte wurden charakterisiert und ihr HPLC-Verhalten im Hinblick auf spätere Experimente zur Abschätzung der Komplexität der Bibliothek untersucht. Zum Aufbau der Bibliotheken wurden 21 Amine, hauptsächlich L-Aminosäuren und kleine Heterocyklen (Schema 2, Satz 1), verwendet. Zusätzliche funktionelle Gruppen der Amine wurden geschützt, um einerseits die Regiochemie zwischen Baustein und

Satz 1:

L-Alaninmethylester, *N*^ω-4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzylsulfonyl-L-arginin-*para*-methoxybenzylamid [a], *O*⁴-*tert*-Butyl-L-asparaginsäuremethylester, *S*-Trityl-L-cysteinbenzylamid [a], Furfurylamin, *O*⁵-*tert*-Butyl-L-glutaminsäuremethylester, *N*^{im}-Trityl-L-histidin-*n*-propylamid [a], L-Isoleucin-*tert*-butylester, L-Leucinmethylester, *N*^ε-Boc-L-Lysinmethylester, L-Methioninmethylester, 4-Methoxybenzylamin, *N*-Methylpyrrol-2-ethylamin, L-Phenylalaninmethylester, L-Prolinmethylester, *O*-*tert*-Butyl-L-serinmethylester, *O*-*tert*-Butyl-L-threoninmethylester, L-Tryptophanmethylester, *O*-*tert*-Butyl-L-tyrosinmethylester, L-Valincyclohexylamid [a], L-Valinmethylester

Satz 2:

L-Alanin-*tert*-butylester, *N*^ω-4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzylsulfonyl-L-arginin, L-Asparagin-*tert*-butylester, *O*⁴-*tert*-Butyl-L-asparaginsäure-*tert*-butylester, *S*-Trityl-L-cystein, *O*⁵-*tert*-Butyl-L-glutaminsäure-*tert*-butylester, Glycinmethylester, *N*^{im}-Trityl-L-histidin, L-Isoleucin-*tert*-butylester, L-Leucin-*tert*-butylester, *N*^ε-Boc-L-Lysinmethylester, L-Methioninmethylester, L-Phenylalanin-*tert*-butylester, L-Prolin-*tert*-butylester, *O*-*tert*-Butyl-L-serin-*tert*-butylester, *O*-*tert*-Butyl-L-threoninmethylester, L-Tryptophanmethylester, *O*-*tert*-Butyl-L-tyrosinmethylester, L-Valin-*tert*-butylester

Schema 2. Zur Synthese der Bibliotheken eingesetzte Amine (Bausteine). Trityl = Triphenylmethyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl. [a] Durch Umsetzung der Fluorenylmethoxycarbonyl(FMOC)-geschützten Aminosäure mit *para*-Methoxybenzylamin, Benzylamin, *n*-Propylamin oder Cyclohexylamin und anschließendes Abspalten der FMOC-Gruppe hergestellt [4, 5].

Zentralmolekül festzulegen und andererseits in organischen Solventien gut lösliche Verbindungen in der Bibliothek zu erhalten^[5]. Ein Äquivalent eines Tetracarbonsäurechlorids wurde mit vier Amin-Äquivalenten einer äquimolaren Mischung der Amine in Dichlormethan kondensiert, so daß die Konkurrenz zwischen den Aminen minimiert und Bibliotheken höchster Komplexität erhalten werden sollten. Anschließend wurden die Ausgangsverbindungen durch Waschen der Bibliotheks-Dichlormethanolösung mit Citronensäure- und NaHCO_3 -Lösungen entfernt. Mit dem Xanthen **2** und 4, 7, 12 oder allen 21 der in Schema 2, Satz 1 aufgeführten primären Amine wurden so Bibliotheken steigender Komplexität aufgebaut, die theoretisch 136, 1225, 10 440 bzw. 97 461 unterschiedliche Verbindungen enthalten^[6].

Die Umsetzungen mit dem Cuban **3** lieferten Mischungen mit weniger Verbindungen (theoretisch 36, 245, 1860 bzw. 16 611), da die Komplexität der Bibliotheken mit steigender Symmetrie des Zentralmoleküls kleiner wird. Obwohl Mischungen sehr vieler unterschiedlicher Verbindungen gebildet werden, lieferte das beschriebene Verfahren einfach handhabbare Pulver. Schwierig war die Überführung dieser lipophilen Bibliotheken in wasserlösliche. Lediglich die schutzgruppenfreien wasserlöslichen Verbindungsmischungen sind für ein Wirkstoffscreening brauchbar.

Durch Hydrazinolyse oder Hydroxylaminolyse wurden die Methylester der Bibliotheken in Hydrazide bzw. Hydroxylamide überführt. Die anschließende Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure/Wasser/Phenol/Thioanisol/Ethandithiol (82.5/5/5/2.5, Reagens K)^[7] lieferte nur mäßig wasserlösliche Öle. Verwendet man zur Bibliothekssynthese die als *tert*-Butylester geschützten Bausteine aus Schema 2, Satz 2, so lassen sich durch Entschützen mit Reagens K und Ausfällen mit Diethylether/*n*-Hexan die Bibliotheken als weiße, in Wasser/Dimethylsulfoxid (9/1) hervorragend lösliche Pulver erhalten.

Neben der Herstellung dieser Bibliotheken galt unser Interesse auch der Bestimmung der Vielfalt der Verbindungen. Zur qualitativen Bewertung wurden die Chromatogramme (Abb. 2) der Mischungen mit theoretisch 136, 1225, 10 440 und 97 461 Verbindungen herangezogen. Komplexere Bibliotheken weisen komplexere Chromatogramme auf: Während in den Chromato-

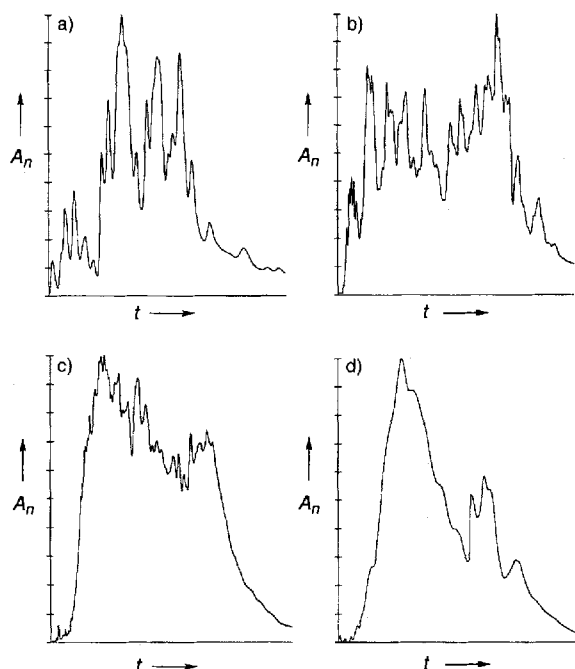


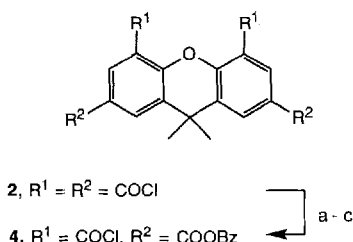
Abb. 2. HPL-Chromatogramme (normiert) der Bibliotheken mit theoretisch 136 (a), 1225 (b), 10440 (c) und 97461 Verbindungen (d) [8]. Die Bibliotheken wurden mit dem Xanthentetracarbonsäurechlorid 2 und den in Schema 2, Satz 1 aufgeführten Aminen aufgebaut.

grammen niedriger Komplexität (Abb. 2a, b) noch problemlos diskrete Signale festgestellt wurden, zeigt das Chromatogramm von theoretisch 97461 Verbindungen statt gut aufgelöster Signale die Einhüllende. Diese Befunde sind mit der Annahme in Einklang, daß in den mit 12 und 21 Bausteinen gebildeten Bibliotheken eine deutlich größere Vielfalt an Verbindungen vorliegt.

Um zu überprüfen, ob unsere Umsetzungen eines Säurechlorids mit den unterschiedlichen Aminen die statistische Zahl an Verbindungen liefern, haben wir kleinere repräsentative Bibliotheken hergestellt und untersucht. Dabei wurde das leicht zugängliche Xanthendicarbonsäurechlorid 4 als Zentralmolekül eingesetzt (Schema 3). Mit 4 und einer Mischung aus zehn ausge-

wählten Bausteinen wurde eine repräsentative Bibliothek mit theoretisch 55 Verbindungen synthetisiert, von denen jede ein anderes Molekulargewicht hat^[6]. Diese Modellbibliothek wurde dann auf die Zahl der vorliegenden Verbindungen untersucht.

Das erhaltene Chromatogramm dieser Bibliothek war dem Chromatogramm der Bibliothek mit 136 Verbindungen



Schema 3. Synthese des Xanthendicarbonsäurechlorids 4. a) Benzylalkohol, Pyridin, 20°C, 2 h, 75%; b) HBr, CH₂Cl₂, 0°C, 3 h, 72%; c) (COCl)₂, Dimethylformamid (kat.), CH₂Cl₂, 3 h Rückfluß, 97% [4].

gen ähnlich. Die etwa 40 Signale deuteten bereits auf das Vorliegen der meisten der gewünschten Verbindungen in der Mischung hin. Die Modellbibliothek wurde daraufhin sowohl direkt als auch nach Trennung in mehrere Fraktionen durch präparative HPLC^[8] plasmadesorptions- oder FAB-massenspektrometrisch (FAB = Fast Atom Bombardment) untersucht. Die Massenspektren enthielten nahezu ausschließlich Signale in dem für die Moleküle der Bibliothek erwarteten Massenbereich. Es

traten nur geringfügige Fragmentierungen auf. Eine detaillierte massenspektrometrische Analyse der Modellbibliothek lieferte 75% der erwarteten Molekülionenpeaks, d.h. es liegt eine beachtliche Zahl der theoretisch erwarteten 55 Verbindungen in der Mischung vor. Mehrere repräsentative wasserlösliche Bibliotheken werden derzeit mit Elektronenspray-MS untersucht, um die Komplexität der Modellbibliotheken zu quantifizieren^[9]. Doch zeigen bereits die vorgestellten Ergebnisse, daß durch Kondensation eines Zentralmoleküls mit einem Satz primärer Amine große und wohldefinierte Bibliotheken kleiner organischer Moleküle mit konformativ eingeschränkter, wirkstoffähnlicher Struktur gebildet werden können.

Um zu prüfen, ob aus unseren Bibliotheken Einzelverbindungen mit interessanten biologischen Eigenschaften gewonnen werden können, haben wir mehrere sehr komplexe Mischungen synthetisiert und getestet. Zur Synthese der Bibliotheken gingen wir von Cubantetracarbonsäurechlorid 3, Xanthentetracarbonsäurechlorid 2 und den 19 in Schema 2, Satz 2 aufgeführten Bausteinen aus. Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Reagens K und Fällung der Bibliotheken aus Diethylether/*n*-Hexan wurden die so gewonnenen weißen Pulver in einem modifizierten Trypsinassay auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der trypsin-katalysierten Spaltung einer Amidbindung untersucht^[10, 11]. Durch das in der nachstehenden Zuschrift^[11] beschriebene Selektionsverfahren konnten wir innerhalb von nur vier Wochen aus diesen Mischungen eine Verbindung erhalten, die das Enzym Trypsin inhibiert. Durch diese Strategie ist es also möglich, aus Bibliotheken von mehreren zehntausend Molekülen rasch eine Verbindung mit den gewünschten biologischen Eigenschaften zu isolieren^[10, 11].

Experimentelles

Allgemeine Beschreibung der Herstellung diversifizierter Bibliotheken: Eine Lösung von Xanthen-2,4,5,7-tetracarbonsäurechlorid 2 (100 mg, 0.217 mmol) und einer definierten Mischung von Aminen (0.88 mmol insgesamt) in 5 mL CH₂Cl₂ wurde unter Argon mit 1 mL Triethylamin versetzt. Es wurde 3 h gerührt, mit 50 mL CH₂Cl₂ verdünnt und anschließend mit 1 M Citronensäure (2 × 75 mL) und gesättigter NaHCO₃-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und zu einem gelblichen Öl eingedunstet, das im Vakuum aufschäumte. Die Schutzgruppen wurden durch Rühren (4 h) bei Raumtemperatur mit Reagens K [7] abgespalten (Reagens K: Trifluoressigsäure/Wasser/Phenol/Thioanisol/Ethandithiol 82.5/5/5/5/2.5). Aus den im Vakuum eingedunsteten Lösungen wurden die Bibliotheken durch Zugabe von kaltem Et₂O/*n*-Hexan (1/1) gefällt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert, fünfmal mit kaltem Et₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Eingegangen am 15. Februar,
veränderte Fassung am 24. Mai 1994 [Z 6696]

- [1] Zur parallelen Synthese von Peptiden sind mehrere Methoden bekannt. Siehe beispielsweise H. M. Geysen, R. M. Meloan, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998–4002; R. A. Houghton *ibid.* **1985**, *82*, 5131–5135; S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773. Übersichten: G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375–391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 367–383; M. R. Pavia, T. K. Sawyer, W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 387–396.
- [2] A. Furka, F. Sebastyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487–493; K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82–84.
- [3] A. Bashir-Hashemi, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 585–586; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 612–613.
- [4] Alle neuen Verbindungen wurden vollständig charakterisiert. Eine detaillierte Beschreibung der Synthesen wird an anderer Stelle publiziert.
- [5] Schutzgruppenstrategien in Peptidsynthesen: M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, **1984**. Allgemeine Verfahren zur Peptidsynthese: M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, **1984**.
- [6] Zur Berechnung der möglichen Kombinationen von Bausteinen mit einem Zentralmolekül wurde ein Computerprogramm entwickelt, das die theoretische Zahl unterschiedlicher Verbindungen, deren Molekulargewichte sowie die entsprechenden Kombinationen von Bausteinen liefert.

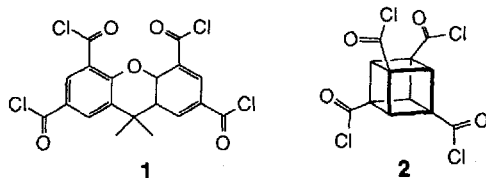
- [7] D. King, C. Fields, G. Fields, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 255–266.
- [8] Analytische HPLC: Waters 6001, UV-Detektor Waters 4901, Ultrasphere-SI-Säule (4.6 mm × 25 cm, 80 Å, 5 µm); Fließgeschwindigkeit: 1.5 mL min⁻¹; Gradientenelution: 100% Hexan → 100% Ethylacetat in 30 min, → 100% Ethylacetat/Methanol (94/6) in 15 min. Präparative HPLC: Novapak-HR-Kieselgelsäule (19 mm × 30 cm, 68 Å, 5 µm); Fließgeschwindigkeit 3.0 mL min⁻¹.
- [9] Zur Untersuchung einer Oligopeptidbibliothek mit Ionenspray-MS und HPLC-MS-Kopplung siehe J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, V. Gnau, J. Brüniges, C. Jung, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 901–930; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 894–896.
- [10] Zur Isolierung eines Trypsininhibitors durch Screening einer synthetischen, kombinatorischen Peptidbibliothek siehe J. Eichler, R. A. Houghton, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 11035–11041.
- [11] T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2162–2164; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, Nr. 20.

Screeningverfahren in Lösung zur Isolierung biologisch aktiver Verbindungen aus einer Molekülbibliothek**

Thomas Carell, Edward A. Wintner
und Julius Rebek, Jr.*

In der vorhergehenden Zuschrift haben wir über einen Zugang zu komplexen Substanzmischungen berichtet^[1], bei dem Bibliotheken kleiner, strukturell rigider Moleküle in Lösung entstehen. Mit seinen als komplexe Mischungen synthetisierten Bibliotheken steht dieses Konzept der gängigen Lehrmeinung in der Organischen Chemie entgegen, wonach Einzelverbindungen mit hoher Reinheit das Ziel einer Synthese sind. Da bei diesem neuen Ansatz weder Kodierungen^[2] noch räumlich isolierte Moleküle^[3] verwendet werden, können die gängigen Screening- und Amplifizierungsmethoden nicht angewendet werden^[4]. Daher haben wir für diese Mischungen ein in Lösung anwendbares Selektionsverfahren entwickelt, über dessen erste Resultate wir nun berichten.

Alle Bibliotheken wurden nach dem folgenden zweistufigen Verfahren aufgebaut^[1]: Im ersten Schritt wurde ein Zentralmolekül, wie das Xanthentetracarbonsäurechlorid **1** oder das Cubantetracarbonsäurechlorid **2**, mit einer Mischung aus 19 als



Bausteine vorgesehenen geschützten L-Aminosäuren kondensiert^[5]. Die Komplexität der entstehenden Mischungen wird durch die Zahl der eingesetzten Bausteine und die Symmetrie des Zentralmoleküls bestimmt. Mit 19 Bausteinen und dem Xanthen **1** sind theoretisch 65 341 Kombinationen möglich. Bei

Verwendung des Cubans **2** mit höherer Symmetrie können lediglich 11 191 Verbindungen mit dem gleichen Bausteinsatz gebildet werden. In der zweiten Stufe wurden die so gewonnenen Bibliotheken mit einem Trifluoressigsäure-Reagens behandelt, um die säurelabilen Schutzgruppen der gebildeten Verbindungen abzuspalten. Nach Fällung aus Diethylether/*n*-Hexan wurden die Mischungen als weiße Pulver erhalten, die in Wasser/Dimethylsulfoxid (DMSO) (9/1) für enzymatische Untersuchungen hinreichend löslich sind^[1].

Das Screeningverfahren beruht auf einem von Houghten et al. bei Peptidmischungen angewendeten Trypsinassay^[6]. Unser Ziel war die Identifizierung einer Verbindung innerhalb der Bibliothek, die die Trypsin-katalysierte Hydrolyse der Amidbindung von *N*²-Benzoyl-D, L-arginin-*para*-nitroanilid (BAPA) inhibieren kann. In den Assays wurde die Aktivität des Inhibitors mit der Geschwindigkeit der Freisetzung von *para*-Nitroanilin durch das Enzym reziprok korreliert. Die bei Zugabe der unterschiedlichen Bibliotheken zu dem Trypsinassay gewonnenen Resultate sind in Abbildung 1 zusammengestellt.

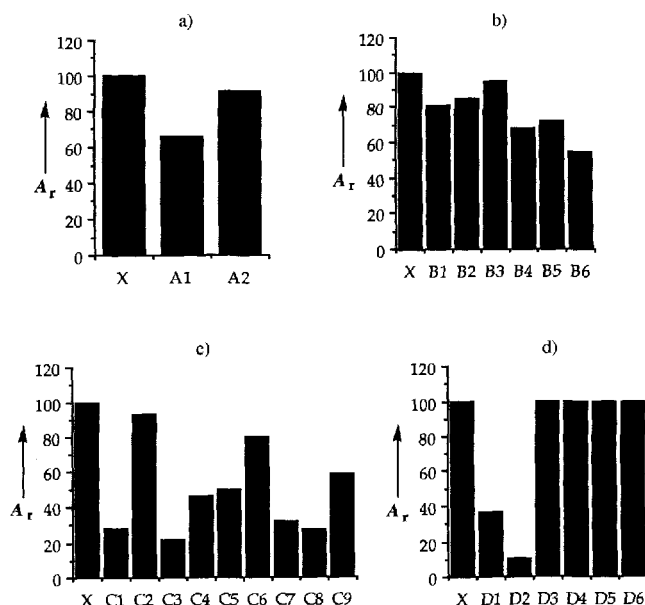


Abb. 1. Trypsinaktivität A_T [%] in Gegenwart der Bibliotheken relativ zu einem in Abwesenheit von Bibliotheksmaterial ermittelten Blindwert (X, A_T = 100%). Jeder Balken gibt die mittlere Trypsinaktivität von vier Messungen wieder. a) Trypsinaktivität [%] der Ausgangsbibliotheken A1 und A2 (je 2.5 mg in 50 µL DMSO), die aus den Zentralmolekülen **1** bzw. **2** und 19 Aminosäure-Bausteinen aufgebaut wurden (**1**, **5**). b) Trypsinaktivität [%] der sechs Teilbibliotheken B1–B6 (je 2.5 mg in 50 µL DMSO), die aus dem Zentralmolekül **1** und 15 der 19 Aminosäure-Bausteine (ohne S-Trt-Cys) aufgebaut wurden. B1: ohne Gruppe G1; B2: ohne Gruppe G2; B3: ohne Gruppe G3; B4: ohne Gruppe G4; B5: ohne Gruppe G5; B6: ohne Gruppe G6. Die Gruppen G1–G6 sind in Tabelle 1 zusammengestellt. c) Trypsinaktivität [%] der neun Teilbibliotheken C1–C9 (je 1.5 mg in 50 µL DMSO), die aus dem Zentralmolekül **1** und acht der neun Bausteine aus den Aminosäuren der Gruppen G1–G3 (Tabelle 1) aufgebaut wurden. C1: ohne Arg; C2: ohne Lys; C3: ohne His; C4: ohne Leu; C5: ohne Ile; C6: ohne Pro; C7: ohne Gly; C8: ohne Ala; C9: ohne Val. d) Trypsinaktivität [%] der sechs Teilbibliotheken D1–D6 (je 0.5 mg in 50 µL DMSO); Zusammensetzung siehe Text und Tabelle 2.

Diagramm a in Abbildung 1 zeigt die Screeningergebnisse der mit **1** und **2** sowie den 19 geschützten Aminosäuren^[5] gebildeten Ausgangsbibliotheken (A1 bzw. A2). Obwohl beide Bibliotheken mit dem gleichen Satz von Bausteinen aufgebaut wurden, verminderte lediglich die Bibliothek A1 die Trypsinaktivität signifikant (etwa 30%). Die Tatsache, daß die Bibliothek A2 die Enzymreaktion nicht wesentlich beeinflußt (91% Aktivität), legt die Vermutung nahe, daß allein die Gegenwart bestimmter

[*] Prof. J. Rebek, Jr., Dr. T. Carell, E. A. Wintner
Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)
Telefax: Int. + 617/253-7929

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert. T. C. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Feodor-Lynen-Stipendium, E. A. W. der National Science Foundation für ein Promotionsstipendium. Prof. J. Stubbe gilt unser Dank für Hinweise zum Enzymassay.